

EUROPEAN PATENT OFFICE

Patent Abstracts of Japan

PUBLICATION NUMBER : 05336956
PUBLICATION DATE : 21-12-93

APPLICATION DATE : 09-06-92
APPLICATION NUMBER : 04149104

APPLICANT : SUMITOMO BAKELITE CO LTD;

INVENTOR : YOKOYAMA KANEHISA;

INT.CL. : C12N 5/02 A23J 7/00 C12M 3/00

TITLE : FLOAT CULTURE OF ANCHORAGE-DEPENDENT CELL

ABSTRACT : PURPOSE: To accomplish the subject float culture by using a specific culture base to form agglomerates with time without making anchorage-dependent cells to adhere to the base and maintain or improve such cells' function.

CONSTITUTION: Firstly, the hydrophobic groups of a phospholipid are put to hydrophobic binding or physical adsorption to the surface of a hydrophobic base ≥ 60 in surface contact angle (generally, a plastic molded product ≥ 60 in contact angle) to obtain a culture base with its surface saturated with hydrophilic polar groups. Thence, this base is seeded with anchorage-dependent cells (pref. a single kind of cells derived from liver, kidney or mammary gland, or mixed multiple cells thereof), thus carrying out culture of the cells while maintaining or improving their function through formation of agglomerates with time with their little adhesion to the base.

COPYRIGHT: (C)1993,JPO&Japio

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-336956

(43)公開日 平成5年(1993)12月21日

(51)Int.Cl. ⁵	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 5/02		7236-4B		
A 2 3 J 7/00		7236-4B		
C 1 2 M 3/00	Z			
	A			

審査請求 未請求 請求項の数3(全4頁)

(21)出願番号 特願平4-149104	(71)出願人 000002141 住友ペークライト株式会社 東京都千代田区内幸町1丁目2番2号
(22)出願日 平成4年(1992)6月9日	(72)発明者 斧原 正幸 東京都千代田区内幸町1丁目2番2号 住 友ペークライト株式会社内 (72)発明者 浅井 秀昭 東京都千代田区内幸町1丁目2番2号 住 友ペークライト株式会社内 (72)発明者 横山 兼久 秋田市土崎港相染町字中島下27-4 住ベ メディカル株式会社内

(54)【発明の名称】足場依存性細胞の浮遊培養方法

(57)【要約】

【構成】表面の接触角が60度以上である疎水性基材の表面に、リン脂質の疎水基を疎水結合もしくは物理吸着させ、表面を親水性にした培養基材に、足場依存性細胞を播種することによって、細胞をほとんど接着させることなく経時的に凝集塊を形成させ、その機能を維持向上させながら浮遊培養を行う。

【効果】本来基材表面に接着しなければ増殖できない足場依存性細胞が、基材表面にほとんど接着することなく増殖し、経時的に凝集塊を形成し、それによって特有の機能が維持向上されるので、浮遊培養が可能になり、また、有用蛋白の大量合成や人工臓器の開発などへの適用も可能である。

1

2

【特許請求の範囲】

【請求項1】 表面の接触角が60度以上である疎水性基材の表面に、リン脂質の疎水基が疎水結合もしくは物理吸着し、基材表面が親水性の極性基でほぼ飽和している培養基材に、足場依存性細胞を播種することによって、該細胞を基材にほとんど接着させることなく経時的に凝集塊を形成させ、その機能を維持向上させながら培養することを特徴とする、足場依存性細胞の浮遊培養方法。

【請求項2】 リン脂質が、ホスファチジルコリン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルイノシトール、スフィンゴミエリン、レシチン、及びこれらの不飽和脂肪酸を水添したもの、あるいはこれらの誘導体からなる群から選ばれた少なくとも1種のリン脂質から成ることを特徴とする、請求項1記載の足場依存性細胞の浮遊培養方法。

【請求項3】 足場依存性細胞が、肝臓、腎臓、脾臓、心臓、乳腺、甲状腺、肺、腸、もしくは皮膚に由来する單一種の細胞、あるいはこれらの混合複合細胞であることを特徴とする、請求項1記載の足場依存性細胞の浮遊培養方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、基材に接着することによって生存し機能を発現する足場依存性細胞の、機能を維持向上させながら細胞を凝集状態で浮遊培養する、新規な培養方法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】 足場依存性細胞が増殖するためには、基本的には基材等の表面に接着していることが必要とされる。しかし、例えば、肝実質細胞は基材に接着させて単層培養しても、そのアルブミン合成能などの機能が極端に低下するといわれている。また一方では、戸部らの報告(第13回日本バイオマテリアル学会予稿集、1991)によれば、肝細胞はアシアロ糖蛋白基材上で多層集合体培養することによって、肝細胞の機能が永く維持できるといわれている。このように、肝細胞などの足場依存性細胞を、基材にほとんど接着せずに凝集塊を形成させて、機能維持する培養方法が盛んに研究されている。

【0003】 また、この様な細胞の状態は、凝集塊、スフェロイド、多層集合体、3次元培養など様々な表現で呼ばれているが、いずれも基本的には同一で、基材に細胞をほとんど接着せずに、その細胞が生体内で存在している時とほぼ同様の立体的な構造を形成すること目的としている。しかし、種々の足場依存性細胞についてのこのような研究は、まだ普遍的な理論や方法を確立するまでには至っていない。また、かなり広範な種類の足場依存性細胞について、ほぼ普遍的にこのような凝集塊を形成させるような基材もまだ見出されてはいない。

10

20

30

40

50

【0004】

【発明が解決しようとする課題】 本発明は、足場依存性細胞をほとんど接着させることなく、経時に凝集塊を形成させ、その機能を維持向上させ得るような培養方法を、普遍的に確立することを目的としたものである。

【0005】

【課題を解決するための手段】 即ち本発明は、表面の接触角が60度以上である疎水性基材の表面に、リン脂質の疎水基が疎水結合もしくは物理吸着し、基材表面が親水性の極性基でほぼ飽和している培養基材に、足場依存性細胞を播種することによって、該細胞を基材にほとんど接着させることなく経時に凝集塊を形成させ、その機能を維持向上させながら培養することを特徴とする、足場依存性細胞の浮遊培養方法。

【0006】 本発明者らは、先に、基材表面にリン脂質を疎水結合させると超親水性の表面が得られ、該表面にはリンパ球などの足場非依存性細胞が全く接着しないことを見出し、その製造方法と共に、特願平3-330940号に開示した。その後、さらに銳意研究を進めた結果、該リン脂質表面上では足場依存性細胞もほとんど接着せず、経時に凝集塊を形成して、細胞の機能が維持向上されることを見出し本発明を完成させるに至った。

【0007】 本発明に於いて使用する細胞培養基材の種類は特に限定しないが、空気中で水滴滴下で測定したその表面の接触角が60度以上、好ましくは80度以上の疎水性材料が好適である。一般的には、接触角60度以上のプラスチック材料の成形品を用いるが、接触角60度以上にしたものであっても何ら差しつかえはなく、使用可能である。表面の接触角が60度未満の基材を用いた場合、リン脂質との疎水結合が不十分となるか、あるいはリン脂質の親水性部分が基材と結合して逆に疎水性部分の方が表面に向いたりするため、表面の親水性が不十分になるか、あるいは親水性のばらつきが異様に大きくなってしまうので好ましくない。

【0008】 本発明に於いて使用するリン脂質は、ホスファチジルコリン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルイノシトール、スフィンゴミエリン、レシチン、及びこれらの不飽和脂肪酸を水添したもの、あるいはこれらの誘導体からなる群から選ばれた少なくとも1種のリン脂質であれば使用することが可能である。従って、単独で用いることも、複数のリン脂質を混合して用いることも可能である。

【0009】 リン脂質の溶解に用いる溶媒は特に限定しないが、リン脂質の溶解が容易で、基材を溶解せたり膨潤せたりしないものであれば何でも使用することができる。具体的には、メタノール、エタノール、プロパンなどのアルコール類、ヘキサン、デカンなどの直鎖状及び環状の脂肪族炭化水素系溶媒など、広範囲の溶媒が使用可能である。

3

【0010】溶液調製時のリン脂質の濃度は臨界ミセル濃度以下で、これはリン脂質によって異なるが、一般的には0.5~0.0005mol/l以下が好ましい。臨界ミセル濃度を越えると、一般的にはリン脂質がミセルを形成するため、目的とする疎水結合を得ることが困難となる。また、濃度の下限は目的に応じて調製すべきで特に限定しないが、あまり希薄溶液になると基材表面を十分にリン脂質によって飽和させることができなくなり、ばらつきの要因となるため適切ではない。リン脂質の分子量や構造によって異なるが、例えばホスファチジルコリンの場合は0.1%以上が好ましい。0.1%未満では、時間を十分にかけてもリン脂質を基材に飽和させることができない、基材表面に十分な親水性を付与させることは出来ず、ばらつきも大きくなる。

【0011】リン脂質溶液と基材とを接触させる時間は特に限定しないが、必要かつ十分なリン脂質の基材への結合または吸着を達成するためには、1分以上72時間以内が好ましい。また、温度はリン脂質の分解、変性を避けるために50℃以下、好ましくは常温以下とするのが適切である。リン脂質を基材に結合させた後の洗浄は、リン脂質の溶解用いたのと同一の溶媒を用いることが基本であるが、必要に応じて異なる溶媒を用いることも可能である。また、最後の乾燥工程は、50℃以下で実施することがリン脂質の分解防止の点で好ましい。

【0012】このようにして得られた細胞培養基材上に足場依存性細胞を播種すると、基材は長期にわたって超親水性を維持し、足場依存性細胞が基材にほとんど接着することなく、ほぼ浮遊の状態で培養でき、かつ経時に細胞同士が凝集して生体内と同様の3次元的な構造を形成する。前述のように、親水性基材表面に対して足場非依存性細胞は全く接着しないが、足場依存性細胞はほとんど接着しないものの、「全く」接着しないのではなく、この極くわずかの接着が本発明に特有の効果をもたらしているものと推測される。

【0013】本発明の方法を適用可能な足場依存性細胞は、肝臓、腎臓、脾臓、心臓、乳腺、甲状腺、肺、腸、もしくは皮膚に由来する単一種の細胞、あるいはこれらの混合複合細胞であり、主としてそれらの細胞の蛋白合成能などを著しく向上させ、生体外で目的の有用蛋白などを大量に迅速に合成することが可能である。また、こ 40

4

れらの性質を利用して、人工肝臓、人工腎臓などの人工臓器の開発の足がかりともなり得るものである。

【0014】

【実施例】以下、実施例によって本発明の作用効果を説明する。

実施例1

射出成形により直径35mm、表面の接触角が90度のポリスチレン樹脂製シャーレを得た。これに、ジパルミトイルホスファチジルコリン(DPPC)をメタノールに溶解して1%の濃度に調製した、DPPC溶液を1ml入れ、約1時間放置した。その後、溶液を捨て、メタノールで1回洗浄し、室温で乾燥させた後、ガンマ線滅菌を施した。Hep G2(ヒト肝癌由来株細胞)を無血清培地(味の素社製ASF104)を用い、1×10⁴個/mlの濃度に調製し、上記シャーレに2mlずつ播種し、37℃5%CO₂インキュベーター内に静置して、培養を行った。

比較例1

住友ベークライト(株)製浮遊培養用シャーレ(MS-1035R 直径35mm)にHep G2細胞を実施例1と同じ条件で播種し培養を行った。

【0015】上記実施例及び比較例について、下記の方法により細胞の培養形態及びアルブミンの分泌能を調べた。

① 培養形態の観察

培養3日、5日、10日目における細胞の形態を、倒立顕微鏡により観察した。

② アルブミン分泌能の測定

培養3日、5日、10日目における培地中のアルブミン濃度を、ELISA法により測定し、同時にシャーレ中の細胞数を測定して、単位細胞あたりのアルブミン量を比較した。実施例1の各培養日数における単位細胞あたりの分泌量を1とし比較例と比較した。

【0016】各観察、測定の結果は表1に示した通りで、本発明における培養方法により、細胞はスフェロイド(凝集塊)を形成し、細胞の機能が維持向上されていることが明白である。

【0017】

【表1】

表1 Hep G2細胞の培養の比較

培養日数	実施例1		比較例1	
	細胞形態	アルブミン分泌能	細胞形態	アルブミン分泌能
3日	凝集塊形成	1	接着単層	0.2
5日	凝集塊形成	1	接着単層	0.14
10日	凝集塊形成	1	接着単層	0.11

【0018】

【発明の効果】以上のように、リン脂質の疎水基を結合
もしくは吸着させて表面を超親水性にした培養基材を用
いる本発明の方法によれば、本来基材表面に接着しなけ
れば増殖できない足場依存性細胞が、基材表面にほとん

ど接着することなく経時的に凝集塊を形成するようにな
り、それによってその細胞に特有の機能を維持向上させ
ながら培養できるので、足場依存性細胞の浮遊培養が可
能になり、また、有用蛋白の大量合成や人工臓器の開発
などにより道を開くものとして極めて有用である。